УДК 619:616.983.636

Грибов К.П., Ключников А.Г., Карташов С.Н.
(ГНУ СКЗНИВИ Россельхозакадемии)

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ПОСЛЕРОДОВЫХ ЭНДОМЕТРИТОВ У КОРОВ, ВЫЗВАННЫХ HAEMOPHILUS SOMNUS

Ключевые слова: эндометрит, гемофилез, Haemophilus somnus.

Актуальность. Диагностика и терапия послеродовых эндометритов у крупного рогатого скота остается нерешенным вопросом вот уже в течение многих лет. Экономические потери от данного заболевания связаны со снижением удоев, затрат на лечение, уничтожением молока контаминированного лечебными препаратами, затрат на работу специалистов, и возможной гибели животного. Применение химиотерапевтических средств для лечения эндометритов сопряжено с целым рядом негативных сторон, и в частности, с недостаточной лечебной эффективностью, снижением качества и количества животноводческой продукции, ингибирующим влиянием на факторы локальной и общей резистентности макроорганизма, отрицательным влиянием на морфофункциональное состояние эндометрия. Вместе с тем в литературе имеются данные, что до 30% послеродовых эндометритов у коров вызываются специфическими возбудителями, существенную долю которых составляют эндометриты вызванные Haemophilus somnus.

В этой связи имеется объективная необходимость в усовершенствовании методов диагностики послеродовых эндометритов у коров.

Цель и задачи исследования. Цель настоящих исследований выяснить эпизоотологические аспекты эндометритов у крупного рогатого скота вызванных Haemophilus somnus, разработать экспресс методы диагностики данной патологии.

Материалы и методы. Работу выполняли с 2007 по 2010 гг. в лаборатории функциональной диагностики болезней сельскохозяйственных животных ГНУ СКЗНИВИ Россельхозакадемии и Ростовской областной ветеринарной лаборатории. Работа выполнялась на базе 3 хозяйств 4 районов Ростовской области по государственной тематике РАСХН.

Для изучения эпизоотической ситуации по гемофилезу были проанализированы результаты лабораторных исследований ГУРО «Ростовская областная ветеринарная лаборатория» и лаборатории функциональной диагностики болезней сельскохозяйственных животных ГНУ СКЗНИВИ Россельхозакадемии. Для микробиологических исследований маточные выделения получали методом ректального массажа матки и вагинального отбора в одноразовые пробирки. С целью определения состава микрофлоры матки осуществляли посев полученного материала на МПА, МПБ, кровяной агар, МПА с 1% глюкозы, и др. Идентификацию изолированных микроорганизмов проводили с учетом их морфологических, культуральных свойств по общепринятым методикам. Для определения вида бактерий использовали пластины биохимические дифференцирующие энтеробактерии и стафилококки, углеводные среды Гиса. Диагностику гемофилеза проводили в лаборатории ГНУ СКЗНИВИ РАСХН и ГУРО «Областная ветеринарная лаборатория», с помощью тест-систем для выявления ДНК микроорганизмов биологическом материале методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле. Cat.№ VET-1-R 0,5.

Результаты исследований.

Исследования на гемофилез проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией в агарозном геле. В основе метода лежит амплификация специфического участка за счет многократного повторения циклов денатурации ДНК в исследуемой пробе, отжига специфических олигонуклеотидных затравок (праймеров) и синтеза цепей ДНК с помощью фермента Taq-полимеразы.

Выделение нуклеиновых кислот проводили с использованием коммерческого набора производства ЦНИИЭ Роспотребнадзора в соответствии с рекомендациями изготовителя. Метод выделения основан на специфической обратимой сорбции ДНК в присутствии хаотропных солей (гуанидинтиоцианат, гуанидинхлорид, NaI, и т.д.) на частицы силикагеля.

Нуклеотидные последовательности генов-мишеней для ПЦР были получены из баз данных NCBI GenBank. Анализ нуклеотидных полноразмерных геномов и участков различных генов бабезий, взятых из базы данных GenBank (NCBI) последовательностей, проводили с применением пакета прикладных программ «BioEdit 6.0».

В результате выравнивания нуклеотидных последовательностей 16S рРНК-гена 10 штаммов H. somnus было выявлено несколько протяженных районов 100%-ной идентичности нуклеотидной последовательности между всеми штаммами, которые и были избраны в качестве мишеней для отжига праймеров и проб. Дизайн праймеров, комплементарных данному участку осуществлялся таким образом, чтобы 3’-терминальные и/или субтерминальные нуклеотидные остатки были комплементарны родоспецифичным остаткам в последовательностях 16S-рРНК и содержали гуанин или цитозин.

Рассчитанные видоспецифичные праймеры для выявления кДНК имели высокую температуру отжига 68°С, это позволило объединить два этапа реакции (отжиг и элонгацию), в один. В результате удалось значительно снизить время постановки реакции, что не повлияло на её специфичность и чувствительность. Постановку ПЦР проводили в реакционной смеси стандартного состава с использованием 10 пкМ каждого праймера, 5 мкл раствора кДНК с добавлением 3 мМ MgCl2. Амплификация проводилась на программируемом термостате «Терцик» (ЗАО «ДНК-технология», Москва) в следующем режиме: предварительная денатурация при 95 С в течение 5 минут, затем 35 циклов, включающих этапы 1) денатурация при 95 С – 10 секунд, отжиг праймеров при 68 С – 10 секунд, 3) элонгация при 72 С – 10 секунд.

В качестве положительного контроля использовали ДНК быделенной бактериологическими методами культуры.

Детекция продуктов амплификации проводилась электрофорезом в 2% агарозном геле в растворе бромистого этидия. Диагностические характеристики разработанной тест-системы изучали в сравнении с классическим бактериологическим методом, подразумевающим выделение чистых культур бактерий из исследуемого материала с использованием элективных питательных среды и последующую морфологическую и биохимическую (либо серологическую) идентификацию выделенных культур. Всего было исследовано 117 клинических образцов (патологический материал, истечения и мазки из носовых ходов), среди которых 22 клинических образца представляли собой материал, полученный от новорожденных коров, находящихся в родильном отделении.

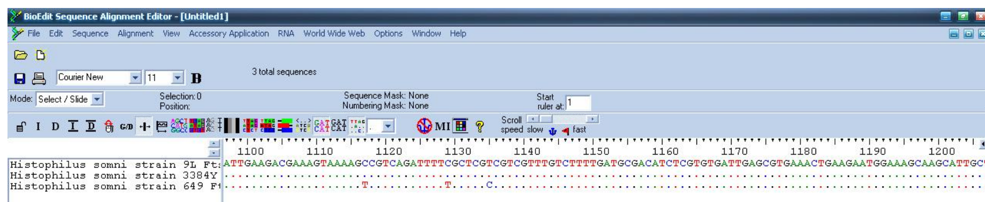


Рис. Выравнивание нуклеотидных последовательностей FtsJ гена нескольких штаммов H. somnus

При изучении клинических образцов метод ПЦР проявил большую чувствительность по сравнению с классическим бактериологическим методом. Так, методом ПЦР H. somnus был выявлен в 31 образце (26,5%), в то время как с использованием бактериологического метода бактериальную обсемененность выявляли в 29 образцах (24,8%).

Возможно, это связано с назначением антибактериальной терапии клинически больным коровам. Поэтому в образцах, полученных от этих животных, присутствовали либо погибшие H. somnus, либо их некультивируемые формы, ДНК которых и определялась методом ПЦР в 1,71% случаев. В этой связи показатели чувствительности и специфичности ПЦР для детекции H. somnus по сравнению с бактериологическим методом составили 100% и 93,55% соответственно.

В структуре акушерско-гинекологических патологий в изучаемых нами хозяйствах на первом месте стоит острый послеродовый эндометрит (54,3 %) от всех случаев оказания акушерско-гинекологической помощи. За ним следуют такие заболевания, как задержание последа, процент которого очень высок, почти у всех коров с задержкой последа в дальнейшем развивался послеродовый эндометрит. Субинво-

люция матки отмечалась в 7%, персистенция желтого тела в 7% случаев, гипофункция яичников в 1 % случаев.

Для послеродовых эндометритов характерна сезонность. Наибольшее количество отелов в изученных хозяйствах происходит в период с ноября по февраль, а послеродовыми эндометритами животные чаще заболевают с января по март месяц, в это время переболевает от 76 до 80% отелившихся животных.

Большое значение для развития эндометрита имеет возраст животного. Наиболее подвержены данной патологии коровы первотелки, среди них переболевает 64,3%, и коровы в возрасте старше 5 лет, среди них переболевает 69,1 %. По данным наших исследований заболеваемость отелившихся коров острым послеродовым эндометритом в исследованных хозяйствах в среднем составляет 54,3% коров. Кроме того нами установлено, что заболеваемость коров послеродовым эндометритом гемофилезной этиологии составляет 43% от общего числа коров заболевших острым послеродовым эндометритом. Наибольшее количество животных заболевает послеродовыми эндометритами в зимне-весенний период, что составляет 62,3 % от общего количества отелившихся коров, а в летне-осенний период-33,7%.

Нами были проведены исследования по изолированию возбудителей послеродового эндометрита из течковых выделений коров и маточных выделений в послеродовый период от тех коров, которые заболели послеродовым эндометритом. При микробиологическом исследовании маточного содержимого от 458 коров 4 хозяйств, больных острым гнойно-катаральным послеродовым эндометритом, из течковой слизи от тех же коров выделено 18 видов микроорганизмов.

Чаще всего встречались следующие патогенны в исследуемом материале: Escherichia coli, Arcanobacter pyogenes, Fusobacterium necrophorum, Bacteroides spp., Staphylococcus spp., Haemophilus somnus, Manheimia hemolytica, Pasteurella spp., Pseudomonas aeruginosa, Clostridium spp., Streptococcus spp., Chlamydophila spp., Ureaplasma spp., Salmonella spp., Mycoplasma spp., Neisseria spp., вирус вирусной диареи КРС (BVD), вирус инфекционного ринотрахеита КРС (BHV-1) (табл. 2).

Выводы. Таким образом, микробный фон матки представлен разнообразными видами условно-патогенных микроорганизмов, которые являются одной из непосредственных причин острого воспаления матки животных, несмотря на то, что H. somnus редко выделяется из течковой слизи коров, при остром послеродовом эндометрите он выделялся у 223 коров из 458, что составило 48,7%,. У 97 коров, H. somnus выделялся как единственный инфекционных агент острого послеродового эндометрита.

Резюме: Изучено распространение эндометритов у коров, вызванных преимущественно Haemophilussomnus. Установлено, что H.somnus выделялся у 48,7% коров с эндометритом.

SUMMARY

The microbic background of a uterus is presented by various kinds of is conditional-pathogenic microorganisms which are one of immediate causes of a sharp inflammation of a uterus of animals in spite of the fact that H. somnus it is seldom allocated from oestrus slime of cows, at sharp postnatal endometritis it was allocated at 223 cows from 458, that has made 48,7 %. At 97 cows, H. somnus the agent sharp postnatal endometritis was allocated as unique infectious.

Keywords:endometritis at cows, hemophilosis, Haemophilus somnus.

Литература

1. Garcia-Delgado, G. A., P. B. Little, and D. A. Barnum. A comparison of various Haemophilus somnus strains. Can. J. Сотр. Med. 2001, p. 380-388.
2. Gogolewski, R. P., S. A. Kania, T. J. Inzana, P. R. Widders, H. D. Liggitt, and L. B. Corbeil.. Protective ability and specificity of convalescent serum from calves with Haemophilus somnus pneumonia. Infect. Immun. 2007 p.1403-1411.
3. Humphrey, J. D. Haemophilus somnus: colonization of the bovine reproductive tract, strain variation and pathogenicity. Ph.D. thesis. University of

Контактная информации об авторах для переписки

Грибов К.П., Ключников А.Г., Карташов С.Н.,

346421, г.Новочеркасск, Ростовское шоссе, СКЗНИВИ. www.skznivi.ru